



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NOVAS ABORDAGENS NA TERAPIA GENÉTICA EM DOENÇAS
MITOCONDRIAIS**

Trabalho submetido por

João Francisco Martins Laureano

Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Novembro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**NOVAS ABORDAGENS NA TERAPIA GENÉTICA EM DOENÇAS
MITOCONDRIAIS**

Trabalho submetido por

João Francisco Martins Laureano

Para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por

Prof. Doutora Evguenia Bekman

Novembro de 2015

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe, que me proporcionou uma educação de luxo, quer a nível académico, quer a nível pessoal. Condicionou positivamente as minhas escolhas e deu-me as bases para que no futuro me possa tornar um homem realizado a todos os níveis.

Ao meu Pai, que mesmo já não estando presente, me faz acreditar que tenho permanentemente uma “estrelinha” que me acompanha e ampara.

Às minhas irmãs, Catarina e Joana, que foram um exemplo de resiliência e força de vontade. A elas devo também a noção de núcleo familiar, um baluarte que nunca desmoronou, mesmo quando tudo o resto parecia fenecer.

Aos meus grandes amigos, Alves, Machado e Sampaio, que melhoraram significativamente a minha inteligência emocional e representam um papel preponderante na minha sanidade mental.

À pessoa que mais ativamente me influenciou na realização deste trabalho, tendo sido fonte de motivação e disciplina, nunca descurando o aconchego emocional que representa na minha vida, a minha namorada Catarina.

À Professora Evguenia, por ter acreditado em mim vezes sem conta, apesar dos sucessivos adiamentos dos prazos de entrega que me vi obrigado a fazer. Mostrou-se sempre disponível e nunca desistiu de me encorajar a terminar este projecto.

Às pessoas supracitadas, além da gratidão, apresento um pedido de desculpa pelo tardio término desta etapa, e por todas as consequências que daí sucederam.

RESUMO

Além do núcleo, a mitocôndria é o único organelo celular que possui o seu próprio genoma, estando este sujeito a mutações que estão na origem das doenças mitocondriais. Estes distúrbios afetam uma em cada 5000 pessoas, aproximadamente. Apesar dos diversos esforços levados a cabo para encontrar uma terapêutica com resultados significativos, ainda não existe uma cura conhecida para este tipo de patologia. Nos últimos anos tem sido feito um progresso notável no que diz respeito à identificação de mutações genéticas causadoras de doenças mitocondriais, no entanto o progresso para a descoberta de tratamentos eficazes tem sido lento. Contribuem para tal complicação uma heterogeneidade genética e clínica muito extensa, bem como a dificuldade em conseguir direcionar fármacos ou ácidos nucleicos para a matriz mitocondrial. Nesta monografia foi feita uma revisão de potenciais soluções terapêuticas, sobretudo pela via genética. Esta abordagem pode ser dividida, essencialmente, em três grupos diferentes: importação de secções de DNA ou RNA para a mitocôndria; manipulação do conteúdo genético mitocondrial; correção de um defeito através da expressão de genes manipulados a partir do núcleo.

ABSTRACT

Besides the nucleus, mitochondria is the only cellular organelle that has its own genome, being subject to mutations that are in the origin of mitochondrial diseases. These disorders affect one in 5000 people, approximately. Despite the main efforts taken to find a therapy with significant results, there isn't any reliably healing therapy yet. In the last few years a remarkable progress has been made in concern to the identification of genetic mutations causing mitochondrial diseases, however the progress to find effective treatments for those disorders remained slow. This is due to a large clinical and genetic heterogeneity, as well as the challenge to target drugs or nucleic acids into the mitochondrial matrix. In this monograph, a review of potentially therapeutic solutions was made, mostly through genetic pathway. This approach remains basically in three different groups: import of sections of DNA or RNA into the mitochondria; manipulation of mitochondrial genetic content; rescue of a defect through the expression of manipulated genes from the nucleus.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABRVIATURAS.....	15
GLOSSÁRIO.....	17
INTRODUÇÃO	19
Capítulo 1 – Mitochondrias	21
1.1. A Cadeia Respiratória.....	22
Capítulo 2 – ADN mitocondrial	25
Capítulo 3 – Doenças Mitochondriais	29
3.1 Neuropatia Hereditária de Leber - LHON	30
3.2 Encefalomiopatia Etilmalónica.....	31
3.3 Síndrome de Kearns-Sayre	31
3.4 Síndrome de MELAS	32
3.5 Oftalmoplegia externa crónica progressiva	32
3.6 Síndrome de Leigh	32
Capítulo 4 – Terapia Farmacológica em Doenças Mitochondriais	35
Capítulo 5 – Terapia Genética em Doenças Mitochondriais	37
5.1. Enzimas de Restrição(endonucleases).....	37
5.2. Nucleases de Dedos de Zinco	38
5.3. TALENS E CRISPR/Cas9 Mitochondria Alvo.....	40
5.4. Genes Expressos Alotopicamente	41
5.5. Terapia Genética de “Outro Reino” (TRANSKINGDOM)	42
5.6. Sobrespressão de Aminoacil ARNt Sintetase.....	45
5.7. Terapia Genética para Distúrbios Mitochondriais Codificados no Núcleo.....	46
CONCLUSÃO	49
BIBLIOGRAFIA	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura mitocondrial de célula eucariótica.....	22
Figura 2 – Cadeia respiratória mitocondrial.....	24
Figura 3 – ADN mitocondrial (mtADN).....	26
Figura 4 – Esquema de patologias de acordo com a mutação do gene de ADNmt.....	33
Figura 5 – Análise de Southern blot das amostras de ADN.....	38
Figura 6 – Mecanismo de actuação da ZFN.....	39
Figura 7 – Corte histológico de retinas tratadas com ND1 seguidas de injeção por rotenona.....	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação genética das doenças mitocondriais do ser humano.....27

Tabela 2 - Terapêutica farmacológica de doenças mitocondriais comprovada através de ensaios clínicos.....36

LISTA DE ABRVIATURAS

aaRSs	Aminoacil-ARNt sintetase
AAV	Vírus Adeno-Associado
acetil-CoA	Acetil coezima A
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADP	Adenosina difosfato
AOX	Oxidase Alternativa
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina trifostato
AVC	CRISPR associado à proteína 9
COX	Citocromo C Oxidase
CPEO	Oftalmoplegia Externa Progressiva Crônica
CRISPR	Conjunto de Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Interespaçadas
FADH ₂	Dinucleótido de flavina e adenina reduzido
HSCGT	Terapia Genética de Células Estaminais Hematopoiéticas
IPL	Camada Plexiforme Interna
KSS	Síndrome de Kearns-Sayre (KSS)
LHON	Neuropatia Óptica Hereditária de Leber
MELAS	Encefalopatia Mitocondrial, Acidose Láctica e Episódios tipo AVC
MNGIE	Encefalomiopatia Neurogastrointestinal Mitocondrial
mtZFN	Nuclease de Dedo de Zinco Mitocondrial
NADH	Dinucleótido Nicotinamida e Adenina reduzida
NARP	Neuropatia, Ataxia e Retinite Pigmentosa
POLG1	Polimerase mitocondrial
TALE	Extensão de Três Aminoácidos em Loop
ZFN	Nuclease de Dedo de Zinco

GLOSSÁRIO

Dedo de zinco: os dedos de zinco são domínios proteico que têm a propriedade de se ligarem ao ADN.

Electroporação: é uma técnica de biologia molecular em que um campo elétrico é aplicado nas células com o objetivo de aumentar a permeabilidade da membrana celular, permitindo que químicos, fármacos ou DNA seja mais facilmente introduzidos na célula.

Expressão alotópica: refere-se à expressão de genes no núcleo da célula que normalmente são expressos apenas no genoma mitocondrial.

Fracçãoamento celular: separação e isolamento de diversos componentes celulares

Heteroplasmia: presença de mais de um tipo de genoma mitocondrial na mesma célula

Híbrido citoplasmático: Célula eucariótica gerada ao fundir o citoplasma de uma célula (citoplasto) noutra célula. Esta técnica é usada para criar linhagens de células com diferentes graus de heteroplasmia.

Homoplasmia: presença de apenas um tipo de genoma mitocondrial na mesma célula

Oxidase alternativa: é uma enzima que faz parte da cadeia respiratória em plantas, assim como em alguns fungos, protistas e possivelmente em alguns animais. A oxidase providencia uma rota alternativa para a passagem de electrões pela cadeia respiratória, para reduzir o oxigénio.

Southern blot: método da biologia molecular que serve para verificar se uma determinada sequência de DNA está ou não presente na amostra de DNA em análise

Transfecção: é o processo de introdução intencional de ácido nucleicos nas células. O termo é usado sobretudo para métodos não-virais nas células eucarióticas.

Transversão: é um processo químico em que uma purina sofre mutação e se torna uma pirimidina, ou vice-versa, ou seja uma reacção em que uma Citosina (C) ou Tirosina (T) se torna uma Adenina (A) ou Guanina (G), ou no sentido inverso, um A ou G se torna um C ou T.

Vírus adeno-associados: com um grau de patogenecidade muito reduzido, tem a capacidade de se ligar a um sitio específico do genoma da célula hospedeira, de forma estável

Vírus lentiviral: pode ser usado para fornecer uma terapia genética altamente eficaz uma vez que têm a capacidade de mudar a expressão das suas células alvo.

INTRODUÇÃO

As mitocôndrias são organelos intracelulares cujas funções são de importância extrema para o normal funcionamento do nosso organismo. Estas têm como principal função a síntese de ATP, que é a fonte principal de energia intracelular. Além das vias metabólicas para produção de energia, as mitocôndrias estão envolvidas noutros processos, como é o caso da homeostase intracelular do cálcio, a apoptose e a regulação da libertação de insulina.

As doenças mitocondriais englobam um extraordinário conjunto de problemas clínicos, comumente abrangem tecidos que têm elevados requisitos de energia, como o cérebro, a retina, o coração, sistemas endócrinos, o fígado e o músculo. Excepto casos raros em que a cirurgia ou o transplante são indicados, ainda não existe nenhum tratamento eficaz para pacientes com distúrbios mitocondriais

Este trabalho tem como objetivo dar a conhecer o que é a mitocôndria, qual a sua importância na célula, bem como a sua constituição genética. Além disso é feito um breve resumo das doenças mitocondriais existentes, as terapias farmacológicas existentes em que foi possível efetuar ensaios clínicos.

Por fim, são dadas a conhecer experiências efectuadas *in vitro* e *in vivo* (rato) onde foi possível manipular geneticamente diversas mutações com potencial terapêutico significativo para futuras pesquisas, embora este tipo de terapias ainda esteja algo distante de ensaios clínicos.

Capítulo 1 – Mitochondrias

Há mais de mil milhões de anos atrás, as células eucarióticas primordiais eram desprovidas da capacidade de metabolizar oxigénio. Porém, desenvolveu-se uma relação simbiótica entre estas e as bactérias aeróbias. Esta relação foi tão benéfica para ambas que se tornou permanente. As bactérias evoluíram assim para mitochondrias. Este organelo permitiu que as células hospedeiras passassem a ter um metabolismo aeróbio, um modo muito mais eficiente de produzir energia do que a respiração anaeróbia. (Dimauro & Schon, 2003)

Nos mamíferos, as mitochondrias estão presentes em todas as células com exceção dos glóbulos vermelhos anucleados do sangue. Têm cerca de 0,5 a 1 µm de diâmetro e até 7 µm de comprimento. A quantidade destes organelos por célula pode variar, sendo que aquelas que mais mitochondrias (mais de 104) apresentam são as que necessitam de maior aporte energético. (Rich & Marechal, 2010)

As mitochondrias são organelos citoplasmáticos revestidos por uma membrana dupla, cada uma delas composta por uma bicamada fosfolipídica. As duas membranas são bastante distintas quer em aspecto quer em propriedades físico-químicas, o que determina a função bioquímica de cada membrana. Enquanto que a membrana externa contém um rácio de 50:50 entre fosfolípidos e proteínas, a interna tem um rácio de 20:80, respetivamente. A primeira é altamente permeável a iões e moléculas, já a segunda é muito mais selecta, o que possibilita uma compartimentalização através da separação entre o ambiente da matriz e do citosol. (Brookes, Yoon, Robotham, Anders, & Sheu, 2004)

A membrana interna possui diferentes pregas denominadas de cristas, pois nesta membrana há presença de muitas proteínas necessárias à respiração celular, e ao terem este aspeto aumentam a área de superfície, tendo em conta o pequeno compartimento em que estão inseridas. Existem modificações na estrutura mitocondrial que se correlacionam com a sua função. Quando a respiração de um tecido aumenta, aumenta também o número de cristas e a sua orientação modifica-se, fazendo com que a densidade de electrões na matriz seja maior.

A membrana dupla, por sua vez, limita dois compartimentos: um entre as duas membranas, o espaço intermembranar e outro por dentro da membrana interna, a matriz. (Koopman et al., 2005)

Pode acrescentar-se ainda que são, em si, providas de uma carga genética própria, o ADN mitocondrial (ADNmt). (Rich & Marechal, 2010)

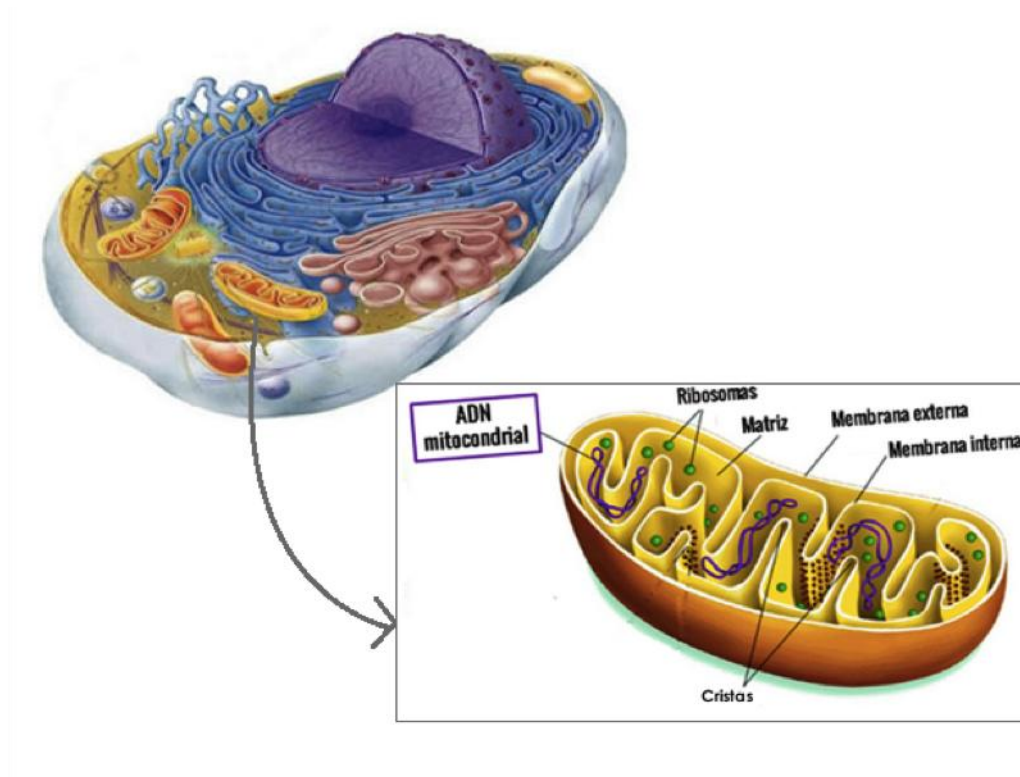


Figura 1 – Estrutura mitocondrial de célula eucariótica.

Desempenham um papel fundamental na homeostase celular. Entre outras funções, as mitocôndrias participam na sinalização celular e apoptose, oxidação do piruvato, o ciclo de Krebs, e no metabolismo de aminoácidos, ácidos gordos, e esteróides. mas das mais importante é, provavelmente, a produção de energia sob a forma de trifosfato de adenosina (ATP), por meio da cadeia transportadora de electrões e o sistema fosforilação oxidativa - cadeia respiratória. (P. F. Chinnery & Schon, 2003)

1.1. A Cadeia Respiratória

Na membrana interna da mitocôndria existem cinco complexos enzimáticos que estão presentes na cadeia respiratória. Cada complexo é composto por múltiplas subunidades, sendo o maior o complexo I, dinucleótido nicotinamida e adenina reduzida (NADH) ubiquinona oxidoreductase, com cerca de 46 sub-unidades polipeptídicas; succinato desidrogenase-ubiquinona oxidoreductase (complexo II, 4

subunidades); a ubiquinona-citocromo c oxidorreductase (complexo III, 11 subunidades); citocromo c oxidase (complexo IV, 13 subunidades) e ATP sintase (complexo V , aproximadamente 16 sub-unidades). A cadeia respiratória também requer dois transportadores de electrões: ubiquinona (coenzima Q10) e citocromo c. (Dimauro & Schon, 2003)

O primeiro processo da respiração celular é a glicólise (Figura 2), em que uma molécula de glicose (constituída por 6 carbonos) é dividida e duas moléculas de 3 carbonos cada – o piruvato. Este é o único processo que ocorre fora da mitochondria, no citoplasma.

O passo seguinte, à glicólise, ocorre na matriz da mitochondria onde o piruvato proveniente da glicolise é convertido em acetil coenzima A (acetil-CoA) (Figura 2), molécula essa que vai entrar no ciclo de Krebs. Neste ultimo, a acetil-CoA sofre uma série de reações que no final resultam na produção de duas moléculas – o NADH e o FADH₂. Estas duas moléculas têm como função o transporte de electrões, onde irão ser preponderantes na quarta e ultima etapa da respiração celular, a fosforilação oxidativa (Rich & Marechal, 2010)

Os cofactores reduzidos NADH e dinucleótido de flavina e adenina reduzido (FADH₂) , gerados pelo metabolismo intermediário dos carboidratos, proteínas e gorduras, doam electrões ao complexo I e II. Estes electrões fluem entre complexos debaixo de um gradiente electroquímico, sendo transportados pelos complexos III e IV e por dois transportadores de electrões: a ubiquinona (coenzima Q10) e o citocromo C.

A energia libertada é utilizada pelos complexos I, III e IV para bombear protões (H⁺) da matriz mitocondrial, para o espaço intermembranar. Este gradiente de protões, que gera a carga do potencial da membrana mitocondrial (a distribuição assimétrica de iões, como o Na⁺, K⁺, Ca²⁺), é aproveitado pelo complexo V para sintetizar a ATP a partir da adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Figura 2). Este processo é denominado de fosforilação oxidativa.

O ATP é a fonte de alta energia usada para praticamente todos os processos de atividade metabólica na célula, e é libertado pela mitochondria em troca de ADP citosólico. (Brookes et al., 2004; Krauss, 2001)

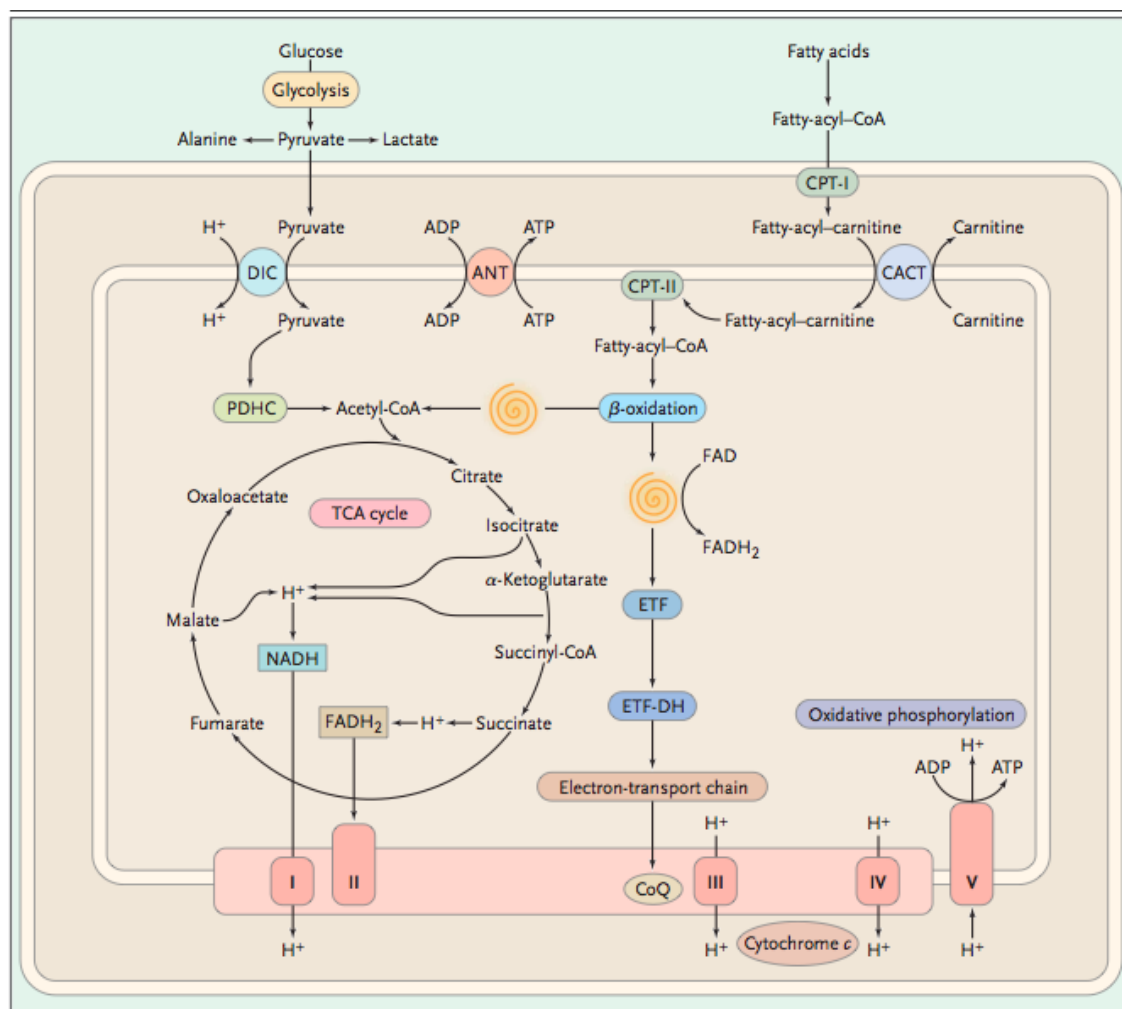


Figura 2 – Cadeia respiratória mitocondrial.
Fonte: (Dimauro & Schon, 2003)

Capítulo 2 – ADN mitocondrial

Pensa-se que as mitocôndrias terão evoluído, pelo menos, há 2000 milhões de anos atrás a partir de bactérias capazes de metabolizar oxigénio, que formaram relações simbióticas com células eucarióticas.

Após esta união, seguiu-se uma transferência gradual da maioria dos genes para o núcleo da célula hospedeira, dando assim origem às mitocôndrias. Observando este organelo compreende-se que as formas e estruturas, reflectem a sua origem bacteriana.

Outro factor que apoia esta ideia é o facto de as mitocôndrias ainda apresentarem algum do seu ADN original.(Rich & Marechal, 2010)

Curiosamente, as mitocôndrias são os únicos organelos da célula além do núcleo, que contêm o seu próprio ADN, chamado ADN mitocondrial (mtADN) bem como capacidade de sintetizar ARN e proteínas(Dimauro & Schon, 2003; Kim et al., 2015). Esta descoberta foi realizada no início da década de 60. (P. F. Chinnery & Schon, 2003)

Porém, foi só em 1981 que o ADN mitocondrial do ser humano foi totalmente sequenciado por Anderson e colaboradores. Sabe-se que possui áreas muito pequenas (cerca de 10%) que não apresentam funções de codificação. Este ADN encontra-se entre as mais pequenas moléculas de ADN, é circular e com um tamanho de 16.569 pares de bases. Anderson e colaboradores assinalaram ainda a todos os genes mitocondriais, as suas funções e os seus produtos genéticos, incluindo 13 proteínas e 24 ácidos nucleicos (2 rARNs e 22 RANt) que são necessários para a síntese intramitocondrial de proteínas intramitocondriais, tal como demonstrado na figura 3(Anderson et al., 1981).

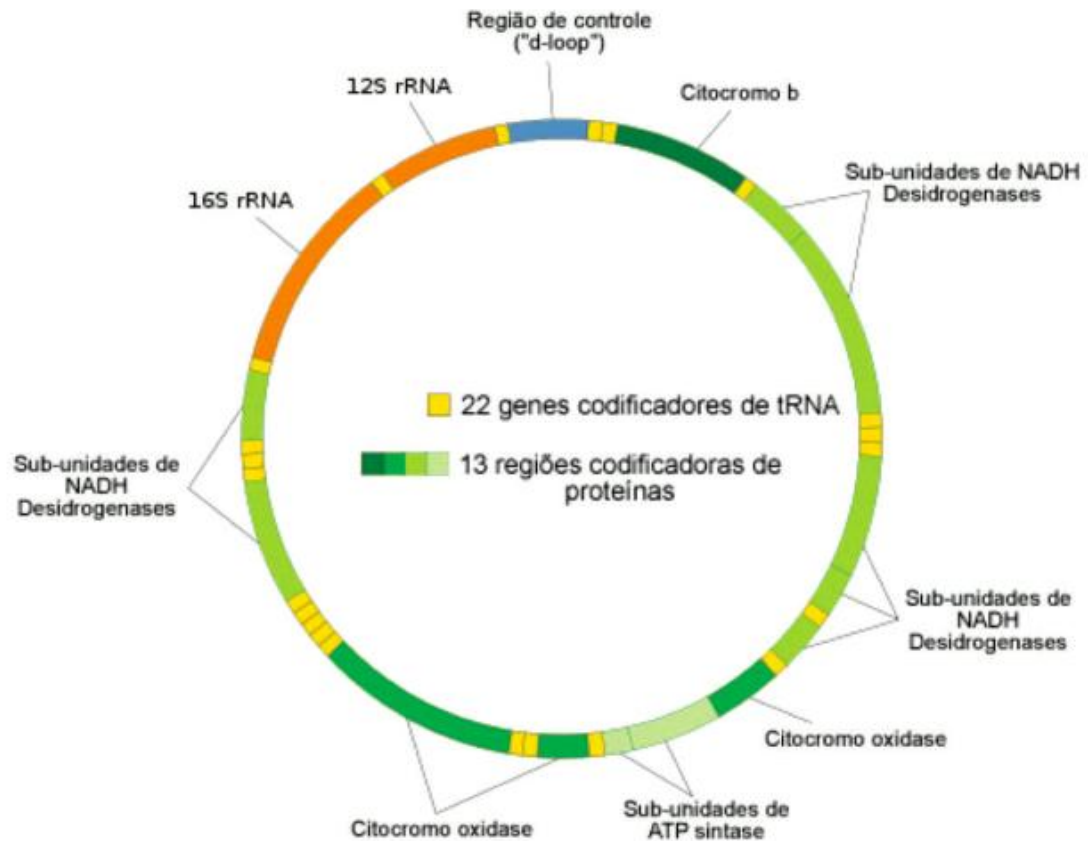


Figura 3 – ADN mitocondrial (mtADN).

Fonte: Reis (Reis & Rodrigues, 2013)

Existem dois sistemas distintos que codificam as proteínas mitocondriais: ADNmt e o ADN nuclear (ADNn). Os genes nucleares codificam para a maior parte dos polipeptídeos da cadeia respiratória. Estes polipeptídeos são sintetizados no citoplasma com uma sequência mitocondrial, alvo que os direciona para a maquinaria de translocação abrangida nas membranas interna e externa. Os componentes da maquinaria de importação (proteínas “TIM e “TOM”), as enzimas que participam no processo de importação, e as proteínas que constituem a formação da cadeia respiratória, são todos produtos dos genes nucleares (P. F. Chinnery & Schon, 2003).

Há centenas ou milhares de mitocôndrias por célula, e cada uma contém aproximadamente 10^3 a 10^4 cópias do genoma mitocondrial. Salienta-se também que o ADNmt contém uma região de controlo denominado o D-Loop, que contém variações genéticas consideráveis. Este constitui a base da medicina forense na identificação humana e tem sido uma ferramenta útil em estudos antropológicos moleculares sobre a origem humana (Dimauro & Schon, 2003; Kim et al., 2015)

Os genes nucleares são também importantes por preservarem o genoma mitocondrial, incluindo os que codificam a DNA polimerase mitocondrial (POLG1) e os produtos que mantêm o equilíbrio apropriado de nucleótidos livres dentro da mitocôndria (TP, TK, DGK, e ANTI). Além disto, o DNA nuclear também codifica para fatores necessários à transcrição e tradução intramitocondrial (TFAM, TFBM1 e TFBM2). Percebe-se então que uma ruptura quer nos genes nucleares, quer nos mitocondriais, pode causar disfunções mitocondriais e doenças humanas (tabela 1). (P.F. Chinnery & Schon, 2003)

Tabela 1 – Classificação genética das doenças mitocondriais do ser humano.
Fonte: (P.F. Chinnery & Schon, 2003)

Tipo de doenças	
Doenças genéticas mitocondriais	Doenças genéticas Nucleares
Rearranjo (deleção e duplicação parcial em grande escala)	Manutenção de ADNmt
-Síndrome Kearns-Sayre -Diabetes e surdez -Síndrome pâncreas Pearson Marrow	-Oftalmoplagia externa progressiva autossômica dominante -Encefalomiopatia neuro-gastrointestinal mitocondrial -Miopatia por depleção de mtADN -Encefalopatia com insuficiência hepática
Mutações pontuais	Doenças primárias da cadeia respiratória
<u>Genes codificadores de proteínas:</u> -LHON -NARP <u>Genes tARN :</u> -MELAS -MERRF -CPEO -Miopatia -Cardiopatia -Diabetes e surdez -Encefalomiopatia <u>Genes rARN:</u> Surdez sensorineural Surdez induzida aminoglicosido	-Síndrome de Leigh: deficiência no complexo I e II -Leucodistrofia e epilepsia mioclônica: deficiência no complexo I -Cardioencefalomiopatia: deficiência no complexo I -Ataxia e atrofia ótica: deficiência no complexo II
	Doenças da estruturação da cadeia respiratória
	-Síndrome de Leigh: deficiência no complexo IV -Cardioencefalomiopatia: deficiência no complexo IV -Encefalopatia e Insuficiência hepática: deficiência no complexo IV -Tubulopatia, Encefalopatia e Insuficiência hepática: deficiência no complexo III

Capítulo 3 – Doenças Mitocondriais

Nos mamíferos, a mitocôndria tem o seu genoma pequeno e circular de 16.5kb que codifica dois rRNAs, 22tRNA e 13 subunidades que entram nos mecanismos de fosforilação oxidativa. Uma correcta expressão do ADNmt é fundamental para o correcto funcionamento da mitocôndria. Assim, mutações ao nível do ADNmt podem ter consequências severas para a célula, uma vez que podem afetar a fosforilação oxidativa. (DiMauro, Hirano, & Schon, 2006)

Os desarranjos mitocondriais são um grupo de doenças hereditárias raras do metabolismo energético, causadas pelo enfraquecimento do sistema mitocondrial de fosforilação oxidativa. As mitocôndrias desempenham uma panóplia de tarefas, incluindo o combate à produção de radicais livres, a iniciação à apoptose, e gerar ATP, por meio da cadeia transportadora de electrões e do sistema de fosforilação oxidativa. Qualquer falha numa destas funções pode conduzir a doenças mitocondriais. (P. Chinnery, Majamaa, Turnbull, & Thorburn, 2012)

As doenças mitocondriais fazem parte de um conjunto pouco vulgar de problemas clínicos que envolvem tecidos com elevados níveis energéticos, como a retina, cérebro, coração, músculo, fígado e sistemas endócrinos. A nível clínico estas doenças traduzem-se desde fraqueza muscular até doenças infantis mortais. Além disso, as disfunções mitocondriais contribuem direta ou indiretamente para a formação de tumores e aceleram processos de envelhecimento. (Ellouze et al., 2008)

Em 1960 descobriu-se que a mitocôndria continha o seu próprio ADN (ADNmt). Desde então houve dois grandes avanços desse sentido: a sequência do ADNmt humano foi publicada em 1981, e em 1988 foram identificadas as primeiras mutações patogénicas do ADNmt. (P. F. Chinnery & Schon, 2003)

A primeira doença mitocondrial foi descoberta pelo endocrinologista sueco Robert Luft, que relatou o caso de uma jovem com hipertiroidismo, caracterizado por suor profuso e perda de peso, independentemente da quantidade de calorias ingerida. Desde este caso, mais de 150 síndromes mitocondriais foram descobertos, sendo a maior parte deles devido a lesões na cadeia respiratória, afectando pelo menos 1 em cada 5000 nados vivos. (Dimauro, 2011)

Apesar de esta doença ser extremamente rara (apenas 2 casos foram descritos), foram abertos caminhos para três décadas de pesquisa clínica e patológica em pacientes

com suspeita de doença mitocondrial. Classificaram-se os pacientes em grupos, com base num padrão, tendo em conta o estado clínico, as anormalidades histológicas e estruturais da mitocôndria, e ensaios bioquímicos. Ficou clara a semelhança clínica em alguns pacientes, o que permitiu definir síndromes como o Síndrome de Kearns-Sayre (KSS) ou oftalmoplegia externa progressiva crónica (CPEO). No entanto houve também uma considerável diversidade fenotípica, o que fez com que muitos pacientes não se enquadrassem num grupo de diagnóstico específico. (P. F. Chinnery & Schon, 2003)

A mutações de ADNmt consideradas patogénicas podem ser heteroplasmáticas (moléculas de ADNmt mutado e não mutado coexistem na mesma célula) ou homoplasmáticas (todas as moléculas de ADNmt nas células de um organismo são mutadas). (Prezant et al., 1993)

Atualmente, mais de 100 mutações pontuais e rearranjos de larga escala no ADNmt humano estão associadas ao largo espectro de manifestações clínicas, abrangendo distúrbios que provocam fraqueza muscular progressiva até doenças infantis fatais. Estudos epidemiológicos recentes mostraram que a prevalência de doenças relacionadas com o ADNmt é de 1 para 6000. Na última década ocorreram avanços significativos na compreensão da patogénese das doenças mitocondriais. Contudo, infelizmente, os tratamentos eficazes para pacientes com doenças mitocondriais são escassos. (P. F. Chinnery & Schon, 2003; Ellouze et al., 2008; R W Taylor, Wardell, Lightowlers, & Turnbull, 2000)

3.1 Neuropatia Hereditária de Leber - LHON

A LHON é uma doença herdada pela parte materna que afecta 1 em cada 25000 pessoas, maioritariamente do sexo masculino. A perda de visão central resulta numa degeneração na camada de células ganglionares da retina e no nervo óptico. Em mais de 95% dos pacientes, a LHON apresenta mutações em genes que codificam componentes do Complexo I, que estão envolvidos na transferência de electrões do NADH para a Coenzima Q. este complexo é composto por 46 subunidades, 7 das quais são codificadas no genoma mitocondrial. Mutações em 5 subunidades codificadas ao nível da mitocôndria estão associadas a esta doença. (Chalmers & Schapira, 1999; Klopstock et al., 2011; Mackey et al., 1996)

As mutações homoplasmáticas de ADNmt estão geralmente associadas a distúrbios em tecidos específicos, incluindo a LHON, perda auditiva neurosensorial e cardiomiopatia hipertrófica de herança materna. Esta última está tipicamente associada a mutações nos genes de tRNAmt, sendo a mutação mt-tRNA^{Ile} (ile – isoleucina) considerada um “hot spot” para doenças cardíacas isoladas. (Prezant et al., 1993; Robert W. Taylor et al., 2003)

A encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial é uma doença autossómica recessiva causada por mutações no gene TYMP que codifica a timidina fosforilase e a sobrecarga de deoxiuridina, o que prejudica a replicação do ADN mitocondrial (Torres-Torronteras et al., 2011).

3.2 Encefalomiopatia Etilmalónica

A encefalopatia etilmalonica (EE) é uma doença mitocondrial autossómica recessiva fatal de aparecimento precoce, e é causada por mutações no gene ETHE1. Este gene codifica uma proteína envolvida na desintoxicação do ácido sulfídrico, que é produzido nos tecidos pelo catabolismo de aminoácidos sulfurados, bem como no intestino delgado através de uma bactéria anaeróbia. Em quantidades vestigiais, o ácido sulfídrico está envolvido na regulação do tónus venoso e, possivelmente, na neurotransmissão. Contudo, em concentrações elevadas, actua como um veneno potente para várias enzimas, como é o caso da citocromo C oxidase (COX) e da acetil-CoA desidrogenase., além de danificar directamente o endotélio vascular. (Tiranti et al., 2009)

Estes efeitos prejudiciais explicam razão dos sinais e sintomas da encefalopatia etilmalonica humana, nomeadamente a falha neurológica progressiva devido à acumulação de múltiplas lesões cerebrais necróticas e hemorrágicas.(Di Meo et al., 2012)

3.3 Síndrome de Kearns-Sayre

Esta doença é habitualmente diagnosticada no tecido muscular, caracterizando-se por grandes deleções únicas, ocorrendo por vezes duplicações ou mutações dos genes do ADNmt que codificam ARNts. (Moraes et al., 1991)

É caracterizada por oftalmoplegia externa e retinopatia pigmentar, verificando-se defeitos na condução cardíaca e ataxia. (DiMauro & Garone, 2010)

3.4 Síndrome de MELAS

Em cerca de 80% dos doentes é encontrada a mutação A3243G. É caracterizada por encefalopatia, episódios tipo AVC e acidose láctica. O diagnóstico é reforçado por cefaleias ou vômitos recorrentes. (Schapira, 2012)

3.5 Oftalmoplegia externa crônica progressiva

Esta patologia é caracterizada por deleções múltiplas do ADNmt identificadas no músculo, por exemplo. Apresentam mutações num dos seguintes genes: POLG1, Twinkle ou ANT1. (Moraes et al., 1991; Spinazzola & Zeviani, 2005)

Sendo uma das mais frequentes manifestações de miopatias mitocondriais, caracterizam-se por limitação multidireccional da mobilidade ocular e ptose progressiva (Carelli, Giordano, & D'Amati, 2003).

3.6 Síndrome de Leigh

Esta síndrome é provocada por mutações no gene nuclear SURF1. É caracterizada por lesões focais, bilaterais e simétricas de degeneração espongiiforme no tronco cerebral, gânglios da base, tálamo, cerebelo, medula e nervos ópticos. Apresenta-se tipicamente na infância, (80% dos casos nos primeiros dois anos de vida) com regressão psicomotora, ataxia e hipotonia e subsequentes sinais de lesão do tronco cerebral (oftalmoplegia, atrofia óptica, ptose, distonia e alterações respiratórias), tendo mau prognóstico. Foram também descritas formas juvenis e do adulto, menos graves (Finsterer, 2008)

Na Figura 4 encontram-se esquematizadas as diferentes patologias causadas por mutações ao nível do ADNmt com correspondência para o gene mutado que está na sua origem. (DiMauro & Schon, 2003)

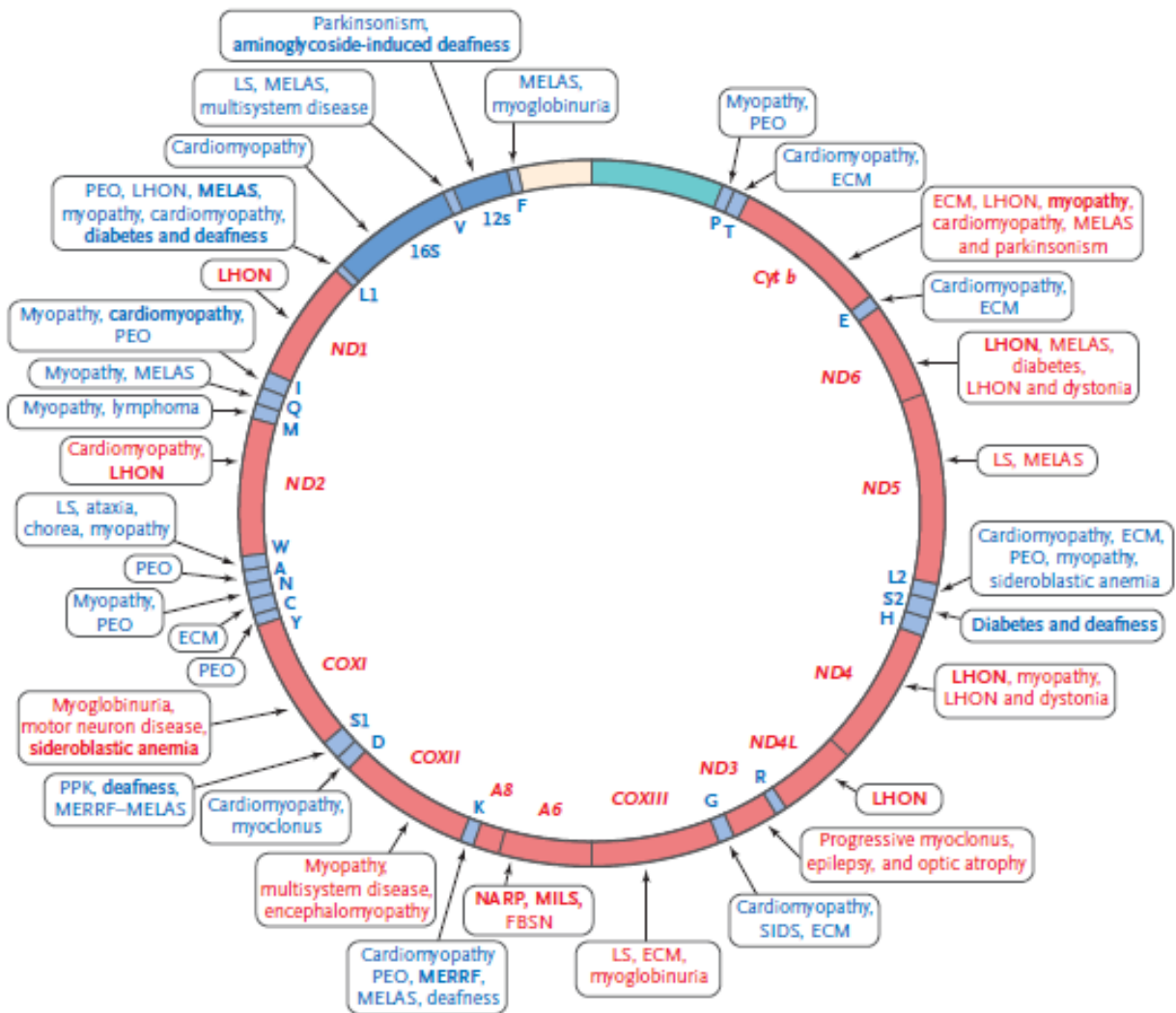


Figura 4 – Esquema de patologias de acordo com a mutação do gene de ADNmt
Fonte: (Dimauro & Schon, 2003)

Capítulo 4 – Terapia Farmacológica em Doenças Mitocondriais

Com os avanços recentes em diagnóstico molecular, as doenças mitocondriais têm vindo a ser identificadas cada vez com mais facilidade. Apesar de haver pouca evidência para comprovar a maioria das intervenções farmacológicas, abre-se exceção para o suplemento de coenzima Q10 (no combate a defeitos genéticos primários na síntese de coenzima Q10).

Além do tratamento sintomático, a terapêutica em doenças mitocondriais centra-se em manter um estado de saúde ótimo, usando medidas preventivas para colmatar o agravamento dos sintomas nas fases de maior stress fisiológico (como a infeção, desidratação ou cirurgia).

A maior parte dos tratamentos mitocondriais têm como objetivo melhorar a função mitocondrial ou colmatar as consequências da disfunção mitocondrial (tratamento sintomático). As terapias têm como destino aumentar o substrato da cadeia respiratória, melhorar a transferência de electrões ao longo desta, ou criar uma alternativa secundaria de complexos específicos de cadeia respiratória. Outras terapias têm como objetivo reduzir os metabolitos tóxicos, aumentar o armazenamento de ATP, ou produzir adaptações na mitocôndria que melhorem a capacidade oxidativa.(P. Chinnery et al., 2012)

Tabela 2- Terapêutica farmacológica de doenças mitocondriais comprovada através de ensaios clínicos

Substância/ Dosagem	Doença Mitocondrial	Amostra/ Tipo de estudo	Resultados	Bibliografia
Coenzima Q10 Ubiquinol: 2-8mg/kg/dia, bid Ubiquinona 5-30mg/kg/dia bid	MELAS	nº pacientes: 30 idade média: 48 Ensaio: cruzado, duplamente cego, controlado por placebo	Atenuou o aumento dos níveis de ácido láctico após exercício físico	(Glover et al., 2010)
Idebenona 900mg/dia, tid	LHON	nº pacientes: 85 idade: 14-64 Ensaio: multicêntrico, duplamente cego, controlado por placebo	Melhoria na visão de um dos olhos em perdas de visão bilateral.	(Klopstock et al., 2011)
		nº pacientes: ND idade média: 28.1 Ensaio: randomizado, duplamente-cego, controlado por placebo	Protecção na perda de cor na visão, particularmente em pacientes com risco iminente de perda total de visão.	(Rudolph et al., 2013)
Riboflavina 100mg/dia	Mutações na ACAD9	Culturas celulares com mutações na ACAD9	Aumento da actividade do complexo 1	(Garone et al., 2013; Haack et al., 2010)
Resveratrol 150mg/dia	Obesidade	Nº pacientes: 11 Idade: ND Ensaio: cruzado, duplamente-cego, randomizado	Mimetizou os efeitos da restrição calórica	(Timmers et al., 2011)

Capítulo 5 – Terapia Genética em Doenças Mitocondriais

5.1. Enzimas de Restrição(endonucleases)

Uma vez que a maior parte das mutações no ADNmt são derivadas de heteroplasmia e têm um nível limite acima do qual a função mitocondrial fica comprometida, ao efectuar manobras que reduzam a heteroplasmia abaixo desse mesmo limiar é possível corrigir estas falhas bioquímicas nas células. (Kanabus, Heales, & Rahman, 2014)

As dificuldades em criar terapias para as doenças mitocondriais levaram ao desenvolvimento de estratégias tendo como alvo o genoma mitocondrial, para seletivamente se extinguirem as moléculas de ADNmt mutado das células e assim permitir que as moléculas de ADNmt normal se consigam repovoar a célula.(DiMauro et al., 2006; R W Taylor et al., 2000)

Um dos métodos que têm sido usados para rectificar o equilíbrio ente o ADNmt normal e o mutante é o de usar endonucleases de restrição com sequências mitocondriais alvo. (Rahman, 2015)

Procedeu-se à eliminação de ADNmt mutante com a mutação Mt8993T→G a partir de híbridos citoplasmáticos em cultura usando uma nova estratégia, ao empregar a enzima de restrição *SmaI* na mitocôndria-alvo .

Os resultados neste estudo indicam que o uso de uma enzima de restrição direccionada para a mitocôndria proporciona uma nova estratégia para a terapia genética em doenças mitocondriais. A vantagem deste método é que a expressão momentânea da enzima de restrição é suficiente para eliminar o ADNmt mutante. Estando este tipo de ADNmt eliminado, a forma normal de ADNmt torna-se predominante na célula, o que faz com que haja uma completa conversão da forma mutante para a forma normal no genoma mitocondrial.

Os híbridos citoplasmáticos de neuropatia, ataxia, e retinite pigmentosa (NARP3-1) foram transfeccionados através do plasmídeo pMACSKkII-pCoxIV-SmaI, e as células transfeccionadas foram posteriormente seleccionadas pelo sistema MACSelect. Repetiram-se 5 ciclos de tranfecção e selecção. O ADN total foi extraído antes, passados 2 dias e novamente 23 dias após a importação da *SmaI* para dentro da

mitocôndria. As amostras de ADN foram digeridas quer com a AflIII apenas ou com ambas as AflIII e SmaI, sendo depois sujeitas a análise por Southern blot (Figura 5).(Tanaka et al., 2002)

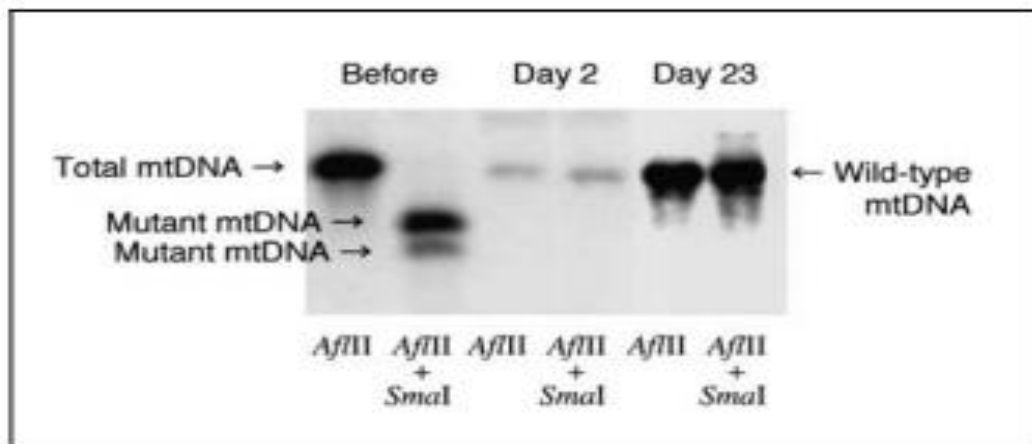


Figura 5 – Análise de Southern blot das amostras de ADN
Fonte: (Tanaka et al., 2002)

5.2. Nucleases de Dedos de Zinco

As mutações e rearranjos de ADNmt que muitas vezes coexistem na mesma célula com ADNmt normal, são uma causa comum de doença humana. As nucleases de dedos de zinco direccionadas para as mitocôndrias podem recuperar disfunções severas ao nível do ADNmt e revelam ter um potencial terapêutico muito promissor.(Gammage, Rorbach, Vincent, Rebar, & Minczuk, 2014)

A degradação selectiva de moléculas de ADN mutado foi alcançada ao direccionar enzimas de restrição para a mitocôndria. No entanto estas enzimas são limitadas uma vez que existe um número muito pequeno de sequências que estejam presentes no ADN mutado mas não no ADNmt normal. (Minczuk, Papworth, Miller, Murphy, & Klug, 2008).

Uma maneira de contornar esta restrição foi desenvolver nucleases com sequências específicas que possam ser talhadas para clivar qualquer sequência alvo. A tecnologia dos dedos de zinco permite que estes se possam ligar a qualquer sequência de ADN pré-determinada. Ao fundir uma determinada proteína de dedo de zinco a uma nuclease, cria-se uma nuclease de dedo de zinco (ZFN) que pode clivar o ADN adjacente ao sítio específico de ligação da proteína de dedo de zinco, proporcionando

(virtualmente) uma espécie de sequencia universal para a clivagem do ADN. (Klug, 2010; Wu, Kandavelou, & Chandrasegaran, 2007)

De forma a testar experimentalmente se os mtZFNs são facilmente importados para dentro da mitocôndria, estudou-se a sua localização celular mediante a expressão transitória em células de osteossarcoma humanas.

A análise de imunofluorescência mostrou que se conseguiram alocar na mitocôndria sem que houvesse detecção de um sinal de mtZFNs no núcleo. Além disso, experiências através de fracionamento celular confirmaram a localização de mtZFNs na mitocôndria. (Gammage et al., 2014)

Foi desenvolvida uma nuclease de dedo de zinco de cadeia simples, em que a proteína de dedo de zinco se liga a dois domínios FokI catalíticos. Este arranjo permite uma clivagem mais eficiente. Ao escolher uma proteína de zinco que fosse seletiva para a sequência m.8993T>G de ADNmt mutado, devia ser possível clivar seletivamente o ADNmt que contivesse esta mutação, deixando o ADNmt normal inalterado.

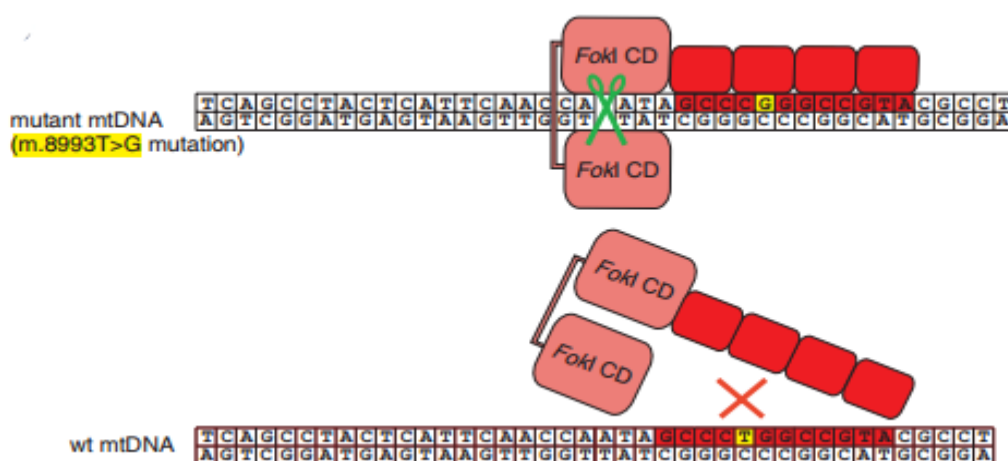


Figura 6 – Mecanismo de actuação da ZFN
Fonte: (Minczuk et al., 2008)

Como demonstrado na figura 6, a proteína de dedo de zinco foi desenhada para se ligar exclusivamente ao sítio de ADNmt mutado. Assim, apenas as moléculas que contêm esta mutação são clivadas (cadeia superior), enquanto que as cópias de ADNmt normal são poupadas (cadeia inferior).

Este estudo demonstrou que uma nuclease de dedo de zinco de cadeia simples pode ser criada. Quando as ZFN específicas para uma mutação pontual patogénica foram direccionadas para células heteroplasmáticas que continham o ADNmt mutado, houve uma eliminação selectiva do ADN mutado, e a proporção de ADNmt normal nestas células aumentou. Assim, tecnologia de nucleases de dedos de zinco pode vir a provar ser útil na manipulação terapêutica da heteroplasmia no tratamento de doenças mitocondriais. (Minczuk et al., 2008)

5.3. TALENS E CRISPR/Cas9 Mitocondria Alvo

Uma extensão de três aminoácidos em loop (TALE) é uma sequência proveniente de uma bactéria constituída por uma sequência repetida de três aminoácidos em tandem, que lhe conferem especificidade de ligação ao ADN. A proteína TALE, que provém de uma bactéria do género das *Xantomonas*, comprova que um grupo importante de patogénios evoluiu para manipular a expressão do género hospedeiro de uma forma altamente adaptável, apesar de ser específica. (Mak, Bradley, Cernadas, Bogdanove, & Stoddard, 2012)

Associou-se a sequência TALE a uma nuclease para localizar a mitocôndria e clivar diferentes tipos de mutações de ADN patogénicas, nomeadamente a neuropatia óptica hereditária de Leber e osteosarcoma. Os resultados revelaram uma redução permanente nas deleções ou mutações pontuais, aumentando a possibilidade que estas nucleases mitocondriais possam ter um fundamento terapêutico para algumas doenças mitocondriais. (Bacman, Williams, Pinto, Peralta, & Moraes, 2013).

Recentemente desenvolveram-se as nucleases de dedos de zinco e as nucleases de TALE, que usam o princípio de reconhecimento de uma sequência. Contudo as dificuldades e “desenhar” a proteína, sintetizá-la e validá-la tem permanecido uma barreira para se adoptarem estas nucleases manipuladas como terapia comum. (Doudna & Charpentier, 2014).

Outra abordagem possível é usar um sistema de modificação no genoma, baseado num conjunto de repetições palindrómicas curtas agrupadas e interespaçadas (CRISPR) associado à proteína 9, formando o complexo Cas9. Trata-se de uma endonuclease que usa uma sequência-piloto contendo uma cadeia de ARN para formar pares de bases com sequências alvo do ADN. A Cas9, ao emparelhar com a sequência

alvo de ADN, cliva-a num sítio específico para que se dê início aos rearranjos.(Rahman, 2015)

Entre outras aplicações, a Cas9 tem a capacidade de corrigir mutações genéticas responsáveis por doenças hereditárias. Uma mutação dominante no gene *Crygc* que é responsável pelas cataratas foi corrigido com sucesso em ratos.(Doudna & Charpentier, 2014)

Apesar desta enzima ter provado ser mais eficiente que as TALENs, o facto da Cas9 necessitar de um componente de ARN é uma limitação uma vez que ainda não é viável transportar ARN para dentro da mitocôndria..(Rahman, 2015)

5.4. Genes Expressos Alotopicamente

Uma transversão no nucleótido 8993 no ADNmt do gene MTATP6 (que codifica a ATPase 6 do complexo V na cadeia respiratória) compromete a síntese de ATP nos seguintes distúrbios mitocondriais: neuropatia, ataxia, retinite pigmentosa e síndrome de Leigh de herança materna.

De modo a ultrapassar este defeito bioquímico, fez-se uma expressão alotópica da proteína ATP6 do tipo normal, a partir de transfecções nucleares para codificarem um gene da ATPase6 que fosse compatível com o código genético. Após a transfecção das células humanas, o polipeptídeo precursor foi expresso, importado para a mitocôndria, processado e incorporado dentro do complexo V. A expressão alotópica relativa à mutação 8993T→G mostrou uma melhoria significativa na recuperação após crescimento em meio selectivo, bem como o aumento significativo na síntese de ATP. Esta foi a primeira demonstração de sucesso de expressão alotópica de um polipeptídeo de ADNmt codificado em células mamárias, e pôde assim formar a base de uma abordagem genética para tratar um certo numero de doenças mitocondriais. (Manfredi et al., 2002)

Foi efetuado um estudo com o objetivo de criar um modelo experimental com LHON. Assim, usou-se uma abordagem otimizada através de expressão alotópica e electroporação in vivo para introduzir o gene humano ND4 com a mutação G11778A nos olhos de ratos (responsável por 60% dos casos de LHON).

Uma análise histológica destas retinas mostrou uma diminuição significativa (30%-40%) no número de células ganglionares da retina comparada com os animais em

que a electroporação in vivo foi efectuada com o gene ND4 normal. O número reduzido de células ganglionares da retina estava associado a uma função visual comprometida. Notavelmente, essa perda de células ganglionares foi recuperada por uma segunda electroporação com o gene ND4 normal, prevenindo assim a diminuição da função visual. (Ellouze et al., 2008)

Este estudo revela que a expressão alotópica é eficaz in vivo e que se prevê uma alternativa viável como terapia de doenças relacionadas com o ADNmt. (Cwerman-Thibault, Augustin, Ellouze, Sahel, & Corral-Debrinski, 2014; Ellouze et al., 2008)

Estão a decorrer neste momento três ensaios clínicos para terapia de LHON através de terapia genética alotópica (dois de segurança e outro de dose-eficaz). (Rahman, 2015)

5.5. Terapia Genética de “Outro Reino” (TRANSKINGDOM)

Nas mitocôndrias dos mamíferos, o mecanismo de produção de energia é suportado pela transferência de electrões para as moléculas de oxigénio, mecanismo cujo passo final é mediado pela citocromo C oxidase (COX). Nas plantas, fungos e microorganismos, além desta via, existe uma oxidase alternativa (AOX) que mantém a transferência de electrões para o oxigénio, mesmo que a via normal esteja bloqueada. Nos casos das doenças mitocondriais em que a fase de fosforilação oxidativa é afectada, uma alternativa a esta via pode vir a tornar-se bastante útil. (Matsukawa, Kamata, & Ito, 2009)

A AOX é um polipeptídeo que pode substituir as subunidades 11 e 13 dos complexos III e IV, respectivamente, sem competir com os mesmos em condições normais. A protecção fornecida pela AOX contra os efeitos tóxicos do cianeto ou da antimicina deverá possibilitar o uso de ratos com a AOX na investigação como potencial alternativa na terapia de doenças mitocondriais, bem como no envelhecimento, devido à inibição de espécies de oxigénio reativas. (El-Khoury et al., 2014)

O efeito mortífero do cianeto em mamíferos mostrou ter como causa a inibição da citocromo oxidase mitocondrial. De forma a testar o poder de substituição da AOX quando a via do citocromo fica bloqueada, expuseram-se ratos de dois tipos (normal vs incorporados com AOX) na presença de uma concentração letal de cianeto gasoso. O

resultado foi de uma taxa de sobrevivência superior a 200% dos ratos mutados com AOX, quando comparados com os primeiros. Esta experiência evidenciou, assim, a capacidade da AOX em substituir a via do citocromo quando esta é bloqueada. (Hakkaart, Dassa, Jacobs, & Rustin, 2006)

A antimicina liga-se à citocromo C redutase no complexo III para inibir a oxidação de ubiquinol na cadeia transportadora de electrões, o que vai bloquear a transferência de electrões entre o citocromo B e C. As consequências da inibição do complexo III resultam num aumento das espécies de oxigénio reactivas e uma redução nos níveis de ATP celular. (Ma et al., 2011)

Verificou-se que, na presença de antimicina, a AOX reduziu eficazmente os níveis de produção de superóxido desencadeados pela ubiquinona. (El-Khoury et al., 2014; Matsukawa et al., 2009).

No estudos supra citados, mostrou-se que a AOX pode ser expressa num mamífero sem que os parâmetros fisiológicos e moleculares major sejam afectados. Mostrou-se também que a AOX é activa *in vivo* contrariando o bloqueio dos mecanismos de produção de energia.

Pela primeira vez ficou demonstrado que uma oxidase alternativa (AOX) funcional pôde ser expressa num mamífero e transmitida às gerações seguintes. Como já tinha sido observado anteriormente em células humanas e moscas, a enzima é direccionada para a mitocôndria, onde consegue interagir na cadeia respiratória. Mais importante que isso, este estudo mostrou que a AOX proveniente a *C. intestinallis* expressa nos ratos não interferiu/ competiu significativamente com a via do citocromo, sendo apenas funcional aquando do bloqueio desta última, numa situação em que a CoQ10 estivesse altamente reduzida. (El-Khoury et al., 2014)

Noutro estudo, a transferência intraocular de ND11 (NADH quinona oxiredutase) foi usada para proteger as células ganglionares da retina num rato induzido com rotenona que mimetizava a LHON. A rotenona inibe a redução da ubiquinona e, quando administrada através de injeção intravítrea nos ratos, causa défices bioquímicos, estruturais e funcionais, idênticos aos observados em pacientes com LHON, havendo uma perda notável de células ganglionares da retina e degeneração do nervo optico. (Hayworth, Rojas, & Gonzalez-Lima, 2008)

O vetor recombinante viral adeno associado (AAV) de serotipo 2 (AAV2/2) que expressa a ND11 a partir de um promotor de citomegalovirus foi administrado no rato usando uma injeção intravítrea única. A injeção intravítrea de AAV possibilita uma

via de administração para a terapia genética, sendo directamente aplicável a pacientes humanos e comumente utilizada para administrar outros fármacos em casos de degeneração macular, por exemplo.

Em suma, a injeção intravítrea de AAV-NDI1 reduziu significativamente a morte das células ganglionares da retina, bem como a atrofia no nervo óptico, típica de olhos não tratados. Além disso levou à preservação da função da retina como comprovado em ressonância magnética e em respostas optocinéticas.

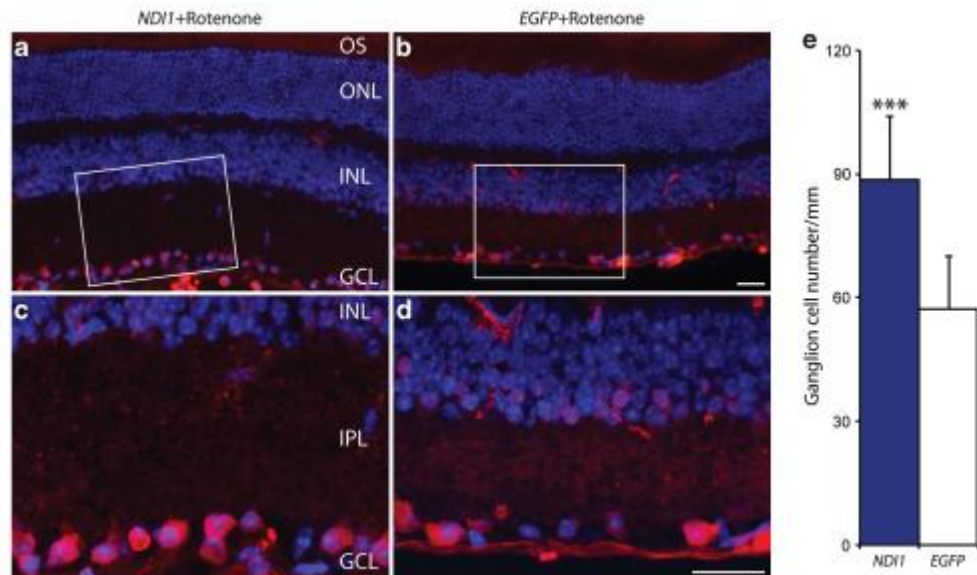


Figura 7 – Corte histológico de retinas tratadas com ND1 seguidas de injeção por rotenona
Fonte: (Chadderton et al., 2012)

Na figura 7 é possível verificar um corte histológico de retinas tratadas com ND1 seguidas de injeção por rotenona. Ratos adultos do tipo normal foram injectados por via intravítrea com AAV-NDI1. Três semanas após a inecção, 1.5nmol de rotenona foi administrada nos olhos pela mesma via, havendo um grupo controlo de ratos apenas injectados com rotenona (sem tratamento). Três semanas após, os olhos foram enucleados, fixados, crio-seccionados (12mm) e processados por imunocitoquímica. (a,b) Vista histológica da retina com e sem tratamento por NDI1, respectivamente. (c, d) visão detalhadas das células ganglionares e da camada plexiforme interna(IPL). Os retângulos em a e b delimitam as áreas mostradas em maior detalhe em c e d, respectivamente. Sabendo que a IPL contém células ganglionares, é visível a discrepância entre c (com tratamento) e d (sem tratamento). e: gráfico de barras com contagem de células ganglionares por 100mm. A coluna azul representa o número correspondente de células ganglionares nos ratos tratados com NDI1 e na coluna branca

o numero de células ganglionares dos ratos que não foram tratados. (Chadderton et al., 2012)

5.6. Sobrespressão de Aminoacil ARNt Sintetase

Direccionar ARNt's mitocondriais é uma estratégia terapêutica atrativa, uma vez que mais de 250 mutações patogénicas esto relacionadas com os genes de ARNt, fazendo destas as mutações mitocondriais mais frequentes. Além disso, uma vez que continua a ser extremamente difícil manipular directamente o ADN mitocondrial humano, direccionar os ARNt pode ser uma alternaniva plausível para terapia genética. As aminoacil sintetases de ARNt (aaRSs) são responsáveis por carregar os ARNt com os seus aminoácidos cognatos no primeiro passo da síntese proteica. (Rahman, 2015)

Entre as mutações existentes no ADNmt, mais de 50% estão localizadas nos genes de ARNt e são responsáveis por uma vasta gama de síndromes que, até ao momento, ainda não têm um tratamento eficaz. As ARNt aminoacil sintetases mitocondriais sobreexpressas de origem comum - cognatos - têm a capacidade de atenuar os efeitos prejudiciais das mutações pontuais quer em micro-organismos quer em células humanas. (Perli et al., 2014)

A mutação A3242G no ARNtLeu causa encefalomiopatia mitocondrial, acidose láctica e sintomas semelhantes aos de um AVC, além de ser responsável por 2% dos casos de diabetes tipo 2. O defeito primário nesta mutação consiste numa aminoacetilação pouco eficiente do ARNtLeu.

Neste estudo investigou-se o mecnismo molecular da mutação A3243G e se a sobreexpressao da leucil-ARNt sintetase mitocondrial humana em híbridos citoplasmáticos portadores da mutação A3243G corrigia as disfunções mitocondriais. Mostrou-se que a alteração da aminoacetilação da ARNtLeu causada pela mutação A3243G levou a defeitos na tradução mitocondrial, reduzindo assim a eficácia da aminoacetilação quer a ARNtLeu, quer na ARNtAla e ARNtMet.

Ficou demonstrado que a transferência da leucil-ARNt sintetase mitocondrial humana para os híbridos citoplasmáticos portadores da mutação A3243G melhorou a eficácia da aminoacetilação, estabilizou os ARNts mitocondriais e aumentou as taxas de

respiração e tradução, tendo consequentemente corrigido a disfunção mitocondrial. (Li & Guan, 2010)

5.7. Terapia Genética para Distúrbios Mitocondriais Codificados no Núcleo

Num estudo foi criado um vector lentiviral capaz de introduzir uma versão totalmente funcional do gene de TYMP in vitro e in vivo. A transdução de células humanas com deficit de timidina fosforilase (TP) contendo este vector permitiu uma expressão estável de TP funcional, que cataboliza o excesso de concentrações de timidina sistémica e de sobrecarga de deoxiuridina presentes no meio extracelular.

Mostrou-se que os níveis de timidina fosforilase puderam ser restabelecidos em células humanas onde os seus níveis eram baixos. Ficou também provado que a terapia genética de células estaminais hematopoiéticas (HSCGT) usando vectores lentivirais pôde melhorar as anormalidades metabólicas num modelo de rato com encefalomiopatia neurogastrointestinal mitocondrial (MNGIE). Observou-se que ao efectuar transfusões plaquetarias, os níveis dos valores disfuncionais de timidina sistémica e de sobrecarga de deoxiuridina foram reduzidos em pacientes com MNGIE. Isto leva a crer que o transplante de células estaminais hematopoiéticas a partir de indivíduos saudáveis pode fornecer uma fonte permanente de níveis de timidina fosforilase, produzindo um benefício clinico significativo. (Torres-Torronteras et al., 2011)

O mecanismo patogenico da encefalopatia etilmalonica consiste na acumulação de ácido sulfídrico na corrente sanguínea e nos tecidos até atingir níveis tóxicos, o que provoca a inibição de enzimas cruciais, como é o caso da COX e da acetil-CoA desidrogenase, além de que danifica directamente o estrato do endotélio.

Foi demonstrado que a clearance de ácido sulfídrico, feita pela expressão do gene ETHE1 num órgão filtrante (exº: fígado), podia diminuir os níveis de ácido sulfídrico, actuando assim como um meio desintoxicante para um tratamento eficaz da doença.

Para testar esta hipótese, usou-se um vector AAV2/8-TBG para expressar o gene ETHE1 no fígado de ratinhos. Ao todo foram tratados 20 animais, em que todos mostraram uma melhoria notável do fenótipo e um aumento significativo no tempo de

vida. Este extraordinário resultado clínico está associado à correcção parcial ou total da maior parte dos índices metabólicos e bioquímicos da doença, incluindo os níveis de ácido etilmalónico e de tiosulfato no plasma, bem como a actividade da COX nos tecidos.

Conclui-se que o tratamento com vírus adeno-associado (AAV) com especificidade para o fígado, pode corrigir, pelo menos parcialmente, a inibição da COX e a Acetil-CoA desidrogenase, mediada pelo ácido sulfídrico, no cérebro, músculo e mucosa do cólon, ao baixar a concentração deste na corrente sanguínea. (Di Meo et al., 2012)

CONCLUSÃO

Os dados obtidos através da investigação em terapia genética com vista a minimizar o impacto negativo de mutações no ADNmt revelam importância para planejar um tratamento médico futuro

A expressão alotópica e o uso de enzimas que podem potencialmente substituir a actividade da fosforilação oxidativa mostram ser áreas de grande potencial para futura exploração. Outra alternativa promissora é a investigação de moléculas naturalmente na célula e na mitocôndria, podendo influenciar a heteroplasmia e a expressão genética.

No entanto, devido a uma base muito limitada de evidência científica e aos poucos dados conclusivos de ensaios clínicos, falar em terapia de doenças mitocôndrias é algo ainda utópico. Além disso, por serem classificadas de doenças raras, a base de pesquisa é escassa. A maioria dos tratamentos baseia-se em alimentos médicos, e há pouco incentivo financeiro para que existam avanços significativos nesse aspecto, uma vez que existem centenas de doenças mitocondriais, resultando num estudo heterogénio da população.

Até à data tem sido complicado criar modelos de roedores que tenham heteroplasmia para mutações no ADNmt, o que impede a confirmação do benefício de terapias genéticas como é o caso do direccionamento de endonucleases. De salientar também que, antes de qualquer “aventura” em ensaios clínicos, é necessário demonstrar a segurança da terapêutica desses animais

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, S., Bankier, a T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, a R., Drouin, J., ... Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806), 457–465. <http://doi.org/10.1038/290457a0>
- Bacman, S. R., Williams, S. L., Pinto, M., Peralta, S., & Moraes, C. T. (2013). Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nature Medicine*, 19(9), 1111–3. <http://doi.org/10.1038/nm.3261>
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 287(4), C817–C833. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- Carelli, V., Giordano, C., & D'Amati, G. (2003). Pathogenic expression of homoplasmic mtDNA mutations needs a complex nuclear-mitochondrial interaction. *Trends in Genetics*, 19(5), 257–262. [http://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00072-6](http://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00072-6)
- Chadderton, N., Palfi, A., Millington-Ward, S., Gobbo, O., Overlack, N., Carrigan, M., ... Jane Farrar, G. (2012). Intravitreal delivery of AAV-NDI1 provides functional benefit in a murine model of Leber hereditary optic neuropathy. *European Journal of Human Genetics*, (June 2012), 62–68. <http://doi.org/10.1038/ejhg.2012.112>
- Chalmers, R. M., & Schapira, A. H. V. (1999). Clinical, biochemical and molecular genetic features of Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1410(2), 147–158. [http://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00163-7](http://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00163-7)
- Chinnery, P. F., & Schon, E. A. (2003). Mitochondria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 74, 1188–1199.
- Chinnery, P., Majamaa, K., Turnbull, D., & Thorburn, D. (2012). Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (4), CD004426. <http://doi.org/10.1007/s11825-012-0347-7>
- Cwerman-Thibault, H., Augustin, S., Ellouze, S., Sahel, J.-A., & Corral-Debrinski, M. (2014). Gene therapy for mitochondrial diseases: Leber Hereditary Optic Neuropathy as the first candidate for a clinical trial. *Comptes Rendus Biologies*, 337(3), 193–206. <http://doi.org/10.1016/j.crv.2013.11.011>
- Di Meo, I., Auricchio, A., Lamperti, C., Burlina, A., Viscomi, C., & Zeviani, M. (2012). Effective AAV-mediated gene therapy in a mouse model of ethylmalonic encephalopathy. *EMBO Molecular Medicine*, 4(9), 1008–1014. <http://doi.org/10.1002/emmm.201201433>

- Dimauro, S. (2011). A history of mitochondrial diseases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 261–76. <http://doi.org/10.1007/s10545-010-9082-x>
- DiMauro, S., & Garone, C. (2010). Historical Perspective on Mitochondrial Medicine. *Dev Disabil Res Rev*, 16(2), 1199–1216. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- DiMauro, S., Hirano, M., & Schon, E. A. (2006). Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle & Nerve*, 34(3), 265–283. <http://doi.org/10.1002/mus.20598>
- Dimauro, S., & Schon, E. A. (2003). Mitochondrial Respiratory Chain disease. *The New England Journal of Medicine*, 348, 2656–2668.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096–1258096. <http://doi.org/10.1126/science.1258096>
- El-Khoury, R., Kempainen, K. K., Dufour, E., Szibor, M., Jacobs, H. T., & Rustin, P. (2014). Engineering the alternative oxidase gene to better understand and counteract mitochondrial defects: state of the art and perspectives. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 2243–9. <http://doi.org/10.1111/bph.12570>
- Ellouze, S., Augustin, S., Bouaita, A., Bonnet, C., Simonutti, M., Forster, V., ... Corral-Debrinski, M. (2008). Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *American Journal of Human Genetics*, 83(3), 373–87. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.08.013>
- Finsterer, J. (2008). Leigh and Leigh-Like Syndrome in Children and Adults. *Pediatric Neurology*, 39(4), 223–235. <http://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2008.07.013>
- Gammage, P. A., Rorbach, J., Vincent, A. I., Rebar, E. J., & Minczuk, M. (2014). Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Molecular Medicine*, 6(4), 458–66. <http://doi.org/10.1002/emmm.201303672>
- Garone, C., Donati, M. A., Sacchini, M., Garcia-Diaz, B., Bruno, C., Calvo, S., ... DiMauro, S. (2013). Mitochondrial Encephalomyopathy Due to a Novel Mutation in ACAD9. *JAMA Neurol*, 70(9), 1177–1179. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Glover, E. I., Martin, J., Maher, A., Thornhill, R. E., Moran, G. R., & Tarnopolsky, M. a. (2010). A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders. *Muscle & Nerve*, 42(September), 739–748. <http://doi.org/10.1002/mus.21758>
- Haack, T. B., Danhauser, K., Haberberger, B., Hoser, J., Strecker, V., Boehm, D., ... Prokisch, H. (2010). Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of

- complex I deficiency. *Nature Genetics*, 42(12), 1131–1135.
<http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Hakkaart, G. a J., Dassa, E. P., Jacobs, H. T., & Rustin, P. (2006). Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Reports*, 7(3), 341–345.
<http://doi.org/10.1038/sj.embor.7400601>
- Hayworth, C. R., Rojas, J. C., & Gonzalez-Lima, F. (2008). Transgenic mice expressing cyan fluorescent protein as a reporter strain to detect the effects of rotenone toxicity on retinal ganglion cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 71(24), 1582–1592. <http://doi.org/10.1080/15287390802414190>
- Kanabus, M., Heales, S. J., & Rahman, S. (2014). Development of pharmacological strategies for mitochondrial disorders. *British Journal of Pharmacology*, 171(8), 1798–1817. <http://doi.org/10.1111/bph.12456>
- Kim, H., Won, S. J., Fabian, C., Kang, M., Szardenings, M., & Shin, M. (2015). Mitochondrial DNA aberrations and pathophysiological implications in hematopoietic diseases, chronic inflammatory diseases, and cancers. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(1), 1–14. <http://doi.org/10.3343/alm.2015.35.1.1>
- Klopstock, T., Yu-Wai-Man, P., Dimitriadis, K., Rouleau, J., Heck, S., Bailie, M., ... Chinnery, P. F. (2011). A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, 134(9), 2677–2686.
<http://doi.org/10.1093/brain/awr170>
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 43(1), 1–21. <http://doi.org/10.1146/annurev-biochem-010909-095056>
- Koopman, W. J. H., Visch, H.-J., Verkaart, S., van den Heuvel, L. W. P. J., Smeitink, J. a M., & Willems, P. H. G. M. (2005). Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 289(4), C881–C890. <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00104.2005>
- Krauss, S. (2001). Mitochondria: Structure and Role in Respiration. *Encyclopedia of Life Sciences*.
- Li, R., & Guan, M.-X. (2010). Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA^{Leu}(UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Molecular and Cellular Biology*, 30(9), 2147–54.
<http://doi.org/10.1128/MCB.01614-09>
- Ma, X., Jin, M., Cai, Y., Xia, H., Long, K., Liu, J., ... Yuan, J. (2011). Mitochondrial electron transport chain complex III is required for antimycin A to inhibit

- autophagy. *Chemistry & Biology*, 18(11), 1474–81.
<http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.08.009>
- Mackey, D. a, Oostra, R. J., Rosenberg, T., Nikoskelainen, E., Bronte-Stewart, J., Poulton, J., ... Norby, S. (1996). Primary pathogenic mtDNA mutations in multigeneration pedigrees with Leber hereditary optic neuropathy. *American Journal of Human Genetics*, 59(2), 481–485.
- Mak, A. N., Bradley, P., Cernadas, R. a, Bogdanove, A. J., & Stoddard, B. L. (2012). Target, 335(6069), 716–719. <http://doi.org/10.1126/science.1216211>.The
- Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J. E., Kwong, J. Q., Guy, J., & Schon, E. a. (2002). Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nature Genetics*, 30(4), 394–9. <http://doi.org/10.1038/ng851>
- Matsukawa, K., Kamata, T., & Ito, K. (2009). Functional expression of plant alternative oxidase decreases antimycin A-induced reactive oxygen species production in human cells. *FEBS Letters*, 583(1), 148–52.
<http://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.11.040>
- Minczuk, M., Papworth, M. A., Miller, J. C., Murphy, M. P., & Klug, A. (2008). Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research*, 36(12), 3926–3938. <http://doi.org/10.1093/nar/gkn313>
- Moraes, C. T., Shanske, S., Tritschler, H. J., Aprille, J. R., Andreetta, F., Bonilla, E., ... DiMauro, S. (1991). mtDNA depletion with variable tissue expression: a novel genetic abnormality in mitochondrial diseases. *American Journal of Human Genetics*, 48(3), 492–501. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Perli, E., Giordano, C., Pisano, A., Montanari, A., Campese, A. F., Reyes, A., ... d'Amati, G. (2014). The isolated carboxy-terminal domain of human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase rescues the pathological phenotype of mitochondrial tRNA mutations in human cells. *EMBO Molecular Medicine*, 6(2), 169–82. <http://doi.org/10.1002/emmm.201303198>
- Prezant, T. R., Agopian, J. V, Bohlman, M. C., Bu, X., Oztas, S., Qiu, W. Q., ... Rotter, J. I. (1993). Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nature Genetics*, 4(3), 289–294. <http://doi.org/10.1038/ng0793-289>
- Rahman, S. (2015). Emerging aspects of treatment in mitochondrial disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. <http://doi.org/10.1007/s10545-015-9855-3>
- Reis, L. M., & Rodrigues, F. W. (2013). Influência do DNA mitocondrial do glaucoma

- Primário De Ângulo Aberto Sob a Visão da Cienciometria. *Rev Bras Oftalmol*, 72(5), 301–306.
- Rich, P. R., & Marechal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in Biochemistry*, 47, 1–24. <http://doi.org/10.1042/BSE047xxxx>
- Rudolph, G., Dimitriadis, K., Büchner, B., Heck, S., Al-Tamami, J., Seidensticker, F., ... Klopstock, T. (2013). Effects of Idebenone on Color Vision in Patients With Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 33(1), 30–36. <http://doi.org/10.1097/WNO.0b013e318272c643>
- Schapira, A. H. (2012). Mitochondrial diseases. *The Lancet*, 379(9828), 1825–1834. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61305-6](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61305-6)
- Spinazzola, A., & Zeviani, M. (2005). Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic signaling. *Gene*, 354, 162–168. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.025>
- Tanaka, M., Borgeld, H.-J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J.-S., Yoneda, M., ... Yagi, K. (2002). Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *Journal of Biomedical Science*, 9(6 Pt 1), 534–541. <http://doi.org/64726>
- Taylor, R. W., Giordano, C., Davidson, M. M., D’Amati, G., Bain, H., Hayes, C. M., ... Turnbull, D. M. (2003). A homoplasmic mitochondrial transfer ribonucleic acid mutation as a cause of maternally inherited hypertrophic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(10), 1786–1796. [http://doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00300-0](http://doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00300-0)
- Taylor, R. W., Wardell, T. M., Lightowlers, R. N., & Turnbull, D. M. (2000). Molecular basis for treatment of mitochondrial myopathies. *Neurological Sciences : Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 21(5 Suppl), S909–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382188>
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., ... Schrauwen, P. (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*, 14(5), 612–22. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.002>
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., ... Zeviani, M. (2009). Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature Medicine*, 15(2), 200–205. <http://doi.org/10.1038/nm0209-220b>
- Torres-Torronteras, J., Gómez, a, Eixarch, H., Palenzuela, L., Pizzorno, G., Hirano, M., ... Martí, R. (2011). Hematopoietic gene therapy restores thymidine phosphorylase activity in a cell culture and a murine model of MNGIE. *Gene Therapy*, 18(8),

795–806. <http://doi.org/10.1038/gt.2011.24>

Wu, J., Kandavelou, K., & Chandrasegaran, S. (2007). Custom-designed zinc finger nucleases: What is next? *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 64(22), 2933–2944. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-7206-8>. Custom-designed